

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-99052

(43)公開日 平成9年(1997)4月15日

(51)Int.Cl.<sup>9</sup>  
A 6 1 L 25/00

識別記号 序内整理番号

F I  
A 6 1 L 25/00

技術表示箇所  
A

審査請求 未請求 請求項の数56 O L (全 22 頁)

(21)出願番号 特願平8-139317

(22)出願日 平成8年(1996)5月31日

(31)優先権主張番号 08/476, 826

(32)優先日 1995年6月7日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(31)優先権主張番号 08/573, 801

(32)優先日 1995年12月18日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591223079  
コラーゲン・コーポレーション  
COLLAGEN CORPORATION  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94303、  
パロ・アルト、フェイバー・プレイス2500  
番

(72)発明者 ウォーザ エム. リー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306、  
パロ アルト, ラ ドナ アベニュー  
3845

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体適合性の粘着剤組成物

(57)【要約】

【課題】 生体粘着剤または外科手術用粘着剤として有用な組成物を提供すること。

【解決手段】 繊維状コラーゲン、繊維分解剤、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含有する組成物であって、ここで、該繊維分解剤は、pH7において、該コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で存在し、該コラーゲンおよび該親水性の合成重合体は、共有結合して、コラーゲン-合成重合体結合物を形成する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 繊維状コラーゲン、繊維分解剤、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含有する組成物であって、ここで、該繊維分解剤は、pH7で該コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で存在し、該コラーゲンおよび該合成重合体は、共有結合して、コラーゲン-合成重合体結合物を形成する、組成物。

【請求項2】 前記繊維分解剤が、生体適合性アルコール、アミノ酸、無機塩および炭水化物からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記繊維分解剤が、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 前記多官能的に活性化した親水性の合成重合体が、多官能的に活性化したポリエチレングリコールである、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 前記多官能的に活性化したポリエチレングリコールが、二官能的に活性化したSG-PEGおよび二官能的に活性化したSE-PEGからなる群から選択される、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 繊維状コラーゲン、生体適合性アルコール、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含有する組成物であって、ここで、該生体適合性アルコールは、pH7にて、該コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で存在し、該コラーゲンおよび該合成重合体は、共有結合して、コラーゲン-合成重合体結合物を形成する、組成物。

【請求項7】 前記繊維分解剤が、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】 前記多官能的に活性化した親水性の合成重合体が、多官能的に活性化したポリエチレングリコールである、請求項6に記載の組成物。

【請求項9】 前記多官能的に活性化したポリエチレングリコールが、二官能的に活性化したSG-PEGおよび二官能的に活性化したSE-PEGからなる群から選択される、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 第一の表面を第二の表面に非外科手術的に付着させる方法であって、コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を提供する工程；該コラーゲンおよび該合成重合体を混合して、該コラーゲンと該合成重合体との間で架橋を開始する工程と；該コラーゲンと該合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、該コラーゲンおよび該合成重合体の混合物を、該第一の表面に適用する工程；および該第一の表面を該第二の表面と接触させて、該第一の表面と該第二の表面との間で癒着を起こす工程を包含する、方法。

【請求項11】 前記第一の表面および第二の表面の一

方が、天然組織の表面である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記第一の表面および第二の表面の一方が、天然組織の表面であり、そして前記第一および第二の表面の他方が、非天然組織の表面および合成移植片の表面から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 前記第一の表面および第二の表面の両方が共に、天然組織の表面である、請求項10に記載の方法。

【請求項14】 前記コラーゲンが、非繊維状コラーゲンである、請求項10に記載の方法。

【請求項15】 前記非繊維状コラーゲンが、繊維状コラーゲンと繊維分解剤とをpH7で、該繊維状コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で混合することにより、調製される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記繊維分解剤が、生体適合性アルコール、アミノ酸、無機塩および炭水化物からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記繊維分解剤が、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記非繊維状コラーゲンが、化学的に変性したコラーゲンである、請求項14に記載の方法。

【請求項19】 前記化学的に変性したコラーゲンが、メチル化コラーゲンである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記非繊維状コラーゲンが、IV型コラーゲン、VI型コラーゲンおよびVII型コラーゲンからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項21】 前記コラーゲンが、繊維状コラーゲンである、請求項10に記載の方法。

【請求項22】 前記コラーゲンが、非繊維状コラーゲンおよび繊維状コラーゲンの混合物である、請求項10に記載の方法。

【請求項23】 前記コラーゲンが、微粒子状の架橋した繊維状コラーゲン、および架橋していない繊維状コラーゲンの混合物を含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンが、グルタルアルデヒドで架橋したコラーゲンを含有する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンが、前記混合物の約25重量%と約95重量%の間の量を構成し、そして前記架橋していない繊維状コラーゲンが、前記混合物の約5重量%と約75重量%の間の量を構成する、請求項23に記載の方法。

【請求項26】 前記コラーゲンが、変性したコラーゲンである、請求項10に記載の方法。

【請求項27】 第一の表面を第二の表面に非外科手術的に付着させる方法であって、非繊維状コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を提供する工程；該非繊維状コラーゲン

および該合成重合体を混合して、該非繊維状コラーゲンと該合成重合体との間で架橋を開始する工程；該非繊維状コラーゲンと該合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、該非繊維状コラーゲンおよび該合成重合体の混合物を、該第一の表面に適用する工程；および該第一の表面を該第二の表面と接触させて、該第一の表面と該第二の表面との間で癒着を起こす工程を包含する、方法。

【請求項28】 前記第一の表面および第二の表面の一方が、天然組織の表面である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記第一の表面および第二の表面の一方が、天然組織の表面であり、そして前記第一および第二の表面の他方が、非天然組織の表面および合成移植片の表面から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項30】 前記第一の表面および第二の表面の両方が共に、天然組織の表面である、請求項27に記載の方法。

【請求項31】 前記非繊維状コラーゲンが、繊維状コラーゲンと繊維分解剤とをpH7で、該繊維状コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに充分な量で混合することにより、調製される、請求項27に記載の方法。

【請求項32】 前記繊維分解剤が、生体適合性アルコール、アミノ酸、無機塩および炭水化物からなる群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 前記繊維分解剤が、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記非繊維状コラーゲンが、化学的に変性したコラーゲンである、請求項27に記載の方法。

【請求項35】 前記化学的に変性したコラーゲンが、メチル化コラーゲンである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記非繊維状コラーゲンが、IV型コラーゲン、VI型コラーゲンおよびVII型コラーゲンからなる群から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項37】 第一の表面を第二の表面に非外科手術的に付着させる方法であって、ここで、該第一の表面および該第二の表面の両方は共に、求核性基を含有し、該方法は、以下の工程を包含する：多官能的に活性化した親水性の合成重合体を、該第一の表面に適用する工程；および該第一の表面を該第二の表面と接触させて、それにより、該合成重合体を、該第一の表面および該第二の表面上の該求核性基と共有結合させて、該第一の表面と該第二の表面との間で癒着を起こす工程。

【請求項38】 前記第一の表面および第二の表面の一方が、天然組織の表面である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記第一の表面および第二の表面の一方が、天然組織の表面であり、そして前記第一および第二の表面の他方が、非天然組織の表面および合成移植片

の表面から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項40】 前記第一の表面および第二の表面の両方が共に、天然組織の表面である、請求項37に記載の方法。

【請求項41】 前記多官能的に活性化した親水性の合成重合体が、多官能的に活性化したポリエチレングリコールである、請求項37に記載の方法。

【請求項42】 前記多官能的に活性化したポリエチレングリコールが、二官能的に活性化したSG-PEGおよび二官能的に活性化したSE-PEGからなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 外科手術後の癒着の形成を防止する方法であって、

コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を提供する工程；該コラーゲンおよび該合成重合体を混合して、該コラーゲンと該合成重合体との間で架橋を開始する工程；該コラーゲンと該合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、該コラーゲンおよび該合成重合体の混合物を、外科手術部位を含む組織、それを取り囲む組織またはそれに隣接した組織に適用する工程；該コラーゲンおよび該合成重合体を、平衡的な架橋が達成されるまで、その場で引き続き架橋する工程；および該外科手術部位の閉鎖を行う工程を包含する、方法。

【請求項44】 前記コラーゲンが、非繊維状コラーゲンである、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 前記非繊維状コラーゲンが、繊維状コラーゲンと繊維分解剤とをpH7で、該繊維状コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに充分な量で混合することにより、調製される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 前記繊維分解剤が、生体適合性アルコール、アミノ酸、無機塩および炭水化物からなる群から選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記繊維分解剤が、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 前記非繊維状コラーゲンが、化学的に変性したコラーゲンである、請求項44に記載の方法。

【請求項49】 前記化学的に変性したコラーゲンが、メチル化コラーゲンである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記非繊維状コラーゲンが、IV型コラーゲン、VI型コラーゲンおよびVII型コラーゲンからなる群から選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項51】 前記コラーゲンが、繊維状コラーゲンである、請求項43に記載の方法。

【請求項52】 前記コラーゲンが、非繊維状コラーゲンおよび繊維状コラーゲンの混合物である、請求項43に記載の方法。

【請求項53】 前記コラーゲンが、微粒子状の架橋した繊維状コラーゲン、および架橋していない繊維状コラ

ーゲンの混合物を含有する、請求項51に記載の方法。

【請求項54】 前記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンが、グルタルアルデヒドで架橋したコラーゲンを含有する、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンが、前記混合物の約25重量%と約95重量%の間の量を構成し、そして前記架橋していない繊維状コラーゲンが、前記混合物の約5重量%と約75重量%の間の量を構成する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記コラーゲンが、変性したコラーゲンである、請求項43に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】(関連出願の相互参照)本願の対応米国特許は、1995年6月7日に出願された米国特許出願第08/476,825号の部分継続出願であり、この米国特許出願第08/476,825号は、1993年11月3日に出願され特許査定された米国特許出願第08/147,227号の部分継続出願であり、この米国特許出願第08/147,227号は、1994年7月12日に発行された米国特許第5,328,955号の部分継続出願であり、この米国特許第5,328,955号は、1992年11月10日に発行された米国特許第5,162,430号の部分継続出願であり、この米国特許第5,162,430号は、1988年11月21日に出願され、続いて放棄された米国特許出願第07/274,071号の部分継続出願である。これらの出願および特許の内容は、本明細書中で参考として援用されており、本願出願人は、現在審査中の出願に対して、米国特許法第120条により、優先権を主張する。

【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、生体粘着剤または外科手術用粘着剤として有用な組成物に関する。さらに特定すると、本発明は、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋したコラーゲンを含有する生体粘着性組成物に関し、そしてこのような組成物を用いて第一の表面と第二の表面との間で癒着を起こす方法(ここで、この第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、好ましくは、天然組織の表面である)、およびこのような組成物を用いて外科手術後の癒着の形成を防止する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】1991年6月18日にNesbunに発行された米国特許第5,024,742号は、アミノ酸含有重合体を、光活性化可能なヘテロ二官能性架橋剤で架橋する方法を開示し、この架橋剤は、光活性化可能な部位および通常部位を有し、該方法は、i)1種またはそれ以上のアミノ酸含有重合体を選択すること；およびii)この架橋剤上の通常部位がこの重合体と結合し、この光活性化可能な部位が結合しないように、この重合体をこの架橋剤と配合することを包含する。光活性化すると、この光活性部位が他のアミノ酸含有重合体と結合するとき、架橋が形成される。得られる架橋したコラーゲン組成物は、目また

は他の傷口を縫合せずに閉鎖するための生体粘着剤として、使用され得る。

【0004】1992年10月20日にSawyerに発行された米国特許第5,156,613号は、生体組織を接合するかまたは再構成する方法を開示しており、該方法は、充填剤物質を提供しつつ、この組織にエネルギーを適用すること、およびこの物質および隣接する生体組織をこのエネルギーで変性するかまたは融解して、この変性したまたは融解した充填剤物質および組織を混合し、それにより、この組織を接合するかまたは再構成することを包含する。生体組織を接合するかまたは再構成する方法もまた、請求されており、該方法は、この生体組織にコラーゲン充填剤物質を与えつつ、光学エネルギーまたは高周波エネルギーを適用すること；適用したエネルギーで、このコラーゲンおよび隣接組織を変性するかまたは融解して、この変性したまたは融解したコラーゲンおよび組織を混合すること；およびこの組織を接合するかまたは再構成することを包含する。

【0005】1992年11月10日にRheeらに発行された米国特許第5,162,430号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)は、親水性の合成重合体(例えば、ポリエチレングリコールの種々の誘導体)にコラーゲンを共有結合することにより調製したコラーゲン-合成重合体結合物を開示している。

【0006】1993年3月9日にTingに発行された米国特許第5,192,316号は、目の光学特性を矯正するための、生体角膜のボーマン膜に直接移植するためのレンズを開示している。このレンズは、水に透過性でヒドロゲルを形成する合成重合体から作製されている。このレンズは、好ましくは、このレンズの角膜に対する癒着性を増しおよび/または上皮細胞の成長を刺激する添加剤を含有する。この添加剤は、フィブロネクチン、コラーゲン、細胞固定タンパク質、抗ゼラチン因子、生体活性ペプチド、寒冷不溶性グロブリン、コンドロネクチン、ラミニン、上皮成長因子(EGF)、またはそれらの混合物であり得る。

【0007】1993年5月11日にBassらに発行された米国特許第5,209,776号は、分離した組織を共に結合する組成物、あるいは組織または補てつ物質を被覆する組成物を開示しており、この組成物は、i)天然ペプチドまたは合成ペプチド、および変性した、架橋した、開裂したまたは短絡した変種または誘導体から選択した少なくとも1種の第一の成分；およびii)第一の成分を支持して、第一の成分と共にマトリックス、ゾルまたはゲルを形成するための第二の成分を含有し、第二の成分は、第一の成分とは異なる。第一の成分は、例えば、アルブミン、α-グロブリン、β-グロブリン、γ-グロブリン、トランスチレチン(transthyretin)、フィブリノーゲン、トロニン、コラーゲン、エラスチン、ケラチン、フィブロイン、フィブリン、またはフィブロネクチンであり

得る。第二の成分は、例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コラーゲン、フルクトース、デキストラン、アガロース、アルギン酸、ペクチン、メチルセルロース、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、CMC、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ポリビニルアルコール、またはポリエチレングリコールであり得る。

【0008】DeVoreらに1993年6月15日に発行された米国特許第5,219,895号は、粘着剤として医学用途に有用なコラーゲン組成物を開示しており、ここで、この組成物は、アシル化剤および／またはスルホン化剤で変性した誘導体化コラーゲンの重合により形成される。この重合は、爆発的な照射、蛍光光線および／または開始剤により、行われる。このアシル化剤は、無水グルタル酸、無水コハク酸、無水ラウリン酸、無水ジグリコール酸、無水メチルコハク酸、無水メチルグルタル酸、無水ジメチルグルタル酸、または無水エキソ-3,6-エポキシ-1,2,3,4-テトラヒドロフタル酸であり得る。柔軟組織の結合には、第一および第二の組織の少なくとも一方の表面の少なくとも一部に、重合可能なコラーゲン組成物を適用すること；この組織表面を開始剤に晒して、このコラーゲンを重合すること；および2個の組織を接触させて、その間に結合を形成することを包含する。

【0009】Brownらに1994年3月1日に発行された米国特許第5,290,552号は、水性媒体中に、フィブリノーゲン、第XIII因子、コラーゲン、トロンビンおよびCa<sup>2+</sup>イオンを含有する外科手術用の粘着剤組成物を開示している。このコラーゲンは、繊維状であり、約5のpH値で不溶であり、流動可能であり、コラーゲン原繊維の天然らせん構造を有し、そしてこの粘着剤のゲル化を起こすことができる。このトロンビンおよびCa<sup>2+</sup>は、このフィブリノーゲンの重合を触媒して凝塊物を形成するのに十分な量で、存在する。

【0010】Rheeらに1994年7月12日に発行された米国特許第5,328,955号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)は、種々の活性化形状のポリエチレングリコールおよび種々の結合を開示しており、これらは、一定範囲の物理的特性および化学的特性を有するコラーゲン-合成重合体結合物を製造するために、使用され得る。

【0011】Matrix Pharmaceuticals, Inc.のヨーロッパ特許公報第341007号は、外科手術用の粘着剤組成物を開示しており、この組成物は、水性組成にて、治療する患者に由来の血漿、この組成物を増粘するのに十分な量(例えば、約5〜30 mg/mlの濃度)のコラーゲン、およびこの血漿中に存在するフィブリノーゲンの重合を触媒して凝塊物を生成するのに十分な量のトロンビン(例えば、約1〜1000のN1Huのトロンビン)を含有する。

【0012】Bausch & Lomb Inc.,のヨーロッパ特許公

報第466383号は、外科手術用途に適切な粘着剤組成物を開示しており、この組成物は、35〜45°Cのメルトインデックス温度を有する天然コラーゲン水溶液を含有する。この組成物は、密に架橋したコラーゲンおよび架橋していないコラーゲンの配合物を含有する。密に架橋したコラーゲンは、熱架橋により得られる。Bausch & Lomb Inc.,のPCT公報第WO 9213578号は、外科手術用の粘着剤組成物を開示しており、この組成物は、33〜60°Cのメルトインデックス温度(MIT)を有するコラーゲンまたはゼラチン水溶液を含有する。傷口の少なくとも1個の表面を、以下のa)またはb)を含有する組成物と接触させることにより、傷口の治癒が促進される：a)コラーゲン水溶液中で培養した上皮細胞の分散体、またはb)天然に生じる精製した生体重合体および成長因子を含有する水溶液。ここで、この組成物は、33〜60°CのMIT、およびこのMITの10°C以上で50,000 cP未満の粘度を有する。

【0013】Flamel Technologiesのヨーロッパ特許公報第575273号は、架橋可能なコラーゲン誘導体を開示しており、この誘導体は、水および／または極性の非プロトン性有機溶媒に溶解性であり、そしてシステイン残基またはシステイン誘導体残基上に、遊離の-SH基または置換した-SH基を含有しており、これらの残基は、少なくとも一部でスペーサー基を介してコラーゲン分子に結合している。不溶性の架橋したコラーゲンもまた開示されており、このコラーゲンでは、分子間鎖架橋の少なくとも一部は、システイン残基により形成されたジスルフィド結合であり、これらのシステイン残基は、少なくとも一部でスペーサー基を介してコラーゲン分子に結合している。請求された組成物は、生体粘着剤または外科手術用粘着剤として、有用である。

【0014】日本特許公報第6070972号は、以下のi)およびii)からなる、生体組織を付着するための組成物を開示している：i)コラーゲンタンパク質の部分加水分解産物、水および多価フェノール化合物を含有する粘着剤成分；およびii)ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドおよびグリセロールアルデヒドの少なくとも1種を含有する水溶液からなる硬化成分。

【0015】1993年11月3日にRheeらが出願し特許査定された米国特許出願第08/147,227号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)は、化学的に変性したコラーゲンを含有するコラーゲン-重合体結合物を開示しており、このコラーゲンは、pH7で実質的に非繊維形状であり、親水性の合成重合体に共有結合して、眼科用途または他の医学用途に使用するための光学的に透明な物質を生成する。

【0016】上で引用した各出版物およびその中に引用したものは、引用した課題を記載および開示するために、全体として本明細書中で参考として援用されている。

【0017】本発明者らはまた、本発明の好ましい実施

態様の詳細な説明を開示し、これには、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋したコラーゲンを含有する生体粘着剤組成物、およびこれらの組成物を用いて第一の表面と第二の表面との間で癒着を起こす方法が含まれ、ここで、第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、天然組織の表面である。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、生体粘着剤または外科手術用粘着剤として有用な組成物を提供することである。本発明の他の目的は、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋したコラーゲンを含有する生体粘着性組成物を提供することである。本発明のさらに他の目的は、このような組成物を用いて第一の表面と第二の表面との間で癒着を起こす方法、およびこのような組成物を用いて外科手術後の癒着の形成を防止する方法を提供することである。

【0019】

【課題を解決するための手段】本発明は、生体粘着剤としての使用に適した組成物を開示しており、この組成物は、繊維状コラーゲン、繊維分解剤、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含有し、ここで、この繊維分解剤は、pH7で、このコラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で存在し、そしてこのコラーゲンおよび合成重合体は、共有結合して、コラーゲン-合成重合体結合物を形成する。本発明の特に好ましい組成物は、繊維状コラーゲン、生体適合性アルコール、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含有し、ここで、この生体適合性アルコールは、pH7で、このコラーゲンを実質的に非繊維状にするのに十分な量で存在し、このコラーゲンおよび合成重合体は、共有結合し

て、コラーゲン-合成重合体結合物を形成する。【0020】第一の表面を第二の表面に結合する一般的な方法では、コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体が混合されて、架橋が開始され、このコラーゲン-合成重合体混合物は、このコラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、第一の表面に適用され、次いで、第二の表面が第一の表面と接触される。第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、好ましくは、天然組織の表面である。

【0021】第一の表面を第二の表面に結合する特に好ましい方法では、非繊維状コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体が混合されて、架橋が開始され、この非繊維状コラーゲン-合成重合体混合物は、このコラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、第一の表面に適用され、次いで、第二の表面が第一の表面と接触される。第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、好ましくは、天然組織の表面である。

【0022】外科手術後の癒着の形成を防止する一般的な方法では、コラーゲン、および多官能的に活性化した

親水性の合成重合体が混合されて、架橋が開始され、このコラーゲン-合成重合体の混合物は、このコラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、外科手術部位を含む組織、それを取り囲む組織またはそれに隣接する組織に適用され、このコラーゲン-合成重合体の混合物は、平衡的な架橋が達成されるまで、その場で引き続き架橋され、そしてこの外科手術部位は、通常の方法により、閉鎖される。

【0023】本発明の非繊維状コラーゲンベースの粘着剤組成物は、光学的に透明であり、それにより、本発明の組成物および方法は、光学的な透明性が必要とされる眼科用途で使用するのに、特に好都合である。さらに、本発明の組成物は、生体適合性で非免疫原性の成分から構成され、これらの成分は、適用される組織部位において、毒性、潜在的な炎症性または免疫原性の反応生成物を残さない。

【0024】本発明者らはまた、この多官能的に活性化した親水性の合成重合体自体が、2個の表面(両表面は共に、求核性基を含む)間での結合が望ましいとき、コラーゲンなしで、生体粘着剤として効果的であることを発見した。第一の表面を第二の表面に結合する方法(ここで、第一の表面および第二の表面の両方は共に、求核性基を含む)では、多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、第一の表面に適用され、次いで、第二の表面が第一の表面と接触される。この多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、第一の表面および第二の表面の両方の表面上の求核性基と共有結合され、それにより、この2個の表面間で癒着が起こる。この多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、溶液形状または乾燥形状(例えば、圧縮した膜)であり得る。

【0025】1実施態様において、上記繊維分解剤は、生体適合性アルコール、アミノ酸、無機塩および炭水化物からなる群から選択される。

【0026】他の実施態様において、上記繊維分解剤は、グリセロールおよびプロピレングリコールからなる群から選択される生体適合性アルコールである。

【0027】さらに他の実施態様において、上記多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、多官能的に活性化したポリエチレングリコールである。

【0028】さらに他の実施態様において、上記多官能的に活性化したポリエチレングリコールは、二官能的に活性化したSG-PEGおよび二官能的に活性化したSE-PEGからなる群から選択される。

【0029】さらに他の実施態様において、上記多官能的に活性化したポリエチレングリコールは、二官能的に活性化したSG-PEGおよび二官能的に活性化したSE-PEGからなる群から選択される。

【0030】さらに他の実施態様において、上記第一の表面および第二の表面の一方は、天然組織の表面であり、そして上記第一および第二の表面の他方は、非天然

組織の表面および合成移植片の表面から選択される。

【0031】さらに他の実施態様において、上記第一の表面および第二の表面の両方は共に、天然組織の表面である。

【0032】さらに他の実施態様において、上記コラーゲンは、非繊維状コラーゲンである。

【0033】さらに他の実施態様において、上記非繊維状コラーゲンは、繊維状コラーゲンと繊維分解剤とをpH 7で、該繊維状コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに充分な量で混合することにより調製される。

【0034】さらに他の実施態様において、上記非繊維状コラーゲンは、化学的に変性したコラーゲンである。

【0035】さらに他の実施態様において、上記化学的に変性したコラーゲンは、メチル化コラーゲンである。

【0036】さらに他の実施態様において、上記非繊維状コラーゲンは、IV型コラーゲン、VI型コラーゲンおよびVII型コラーゲンからなる群から選択される。

【0037】さらに他の実施態様において、上記コラーゲンは、繊維状コラーゲンである。

【0038】さらに他の実施態様において、上記コラーゲンは、非繊維状コラーゲンおよび繊維状コラーゲンの混合物である。

【0039】さらに他の実施態様において、上記コラーゲンは、微粒子状の架橋した繊維状コラーゲン、および架橋していない繊維状コラーゲンの混合物を含有する。

【0040】さらに他の実施態様において、上記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンは、グルタルアルデヒドで架橋したコラーゲンを含有する。

【0041】さらに他の実施態様において、上記微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンは、前記混合物の約25重量%と約95重量%の間の量を構成し、そして前記架橋していない繊維状コラーゲンは、前記混合物の約5重量%と約75重量%の間の量を構成する。

【0042】さらに他の実施態様において、上記コラーゲンは、変性したコラーゲンである。

【0043】

【発明の実施の形態】本発明に従って、生体粘着剤または外科手術用粘着剤としての使用に適切な組成物は、多官能的に活性化した親水性の合成重合体でコラーゲンを架橋することにより、調製される。本明細書中で使用する用語「生体粘着剤」および「外科手術用粘着剤」とは、2種の天然組織の表面間で、または天然組織の表面と非天然組織の表面または合成移植片の表面との間で、一時的結合または恒久的結合を生じ得る生体適合性の組成物を表すために、交換可能に用いられる。

【0044】本発明の生体粘着剤組成物を調製するためには、まず、コラーゲンおよび多官能的に活性化した親水性の合成重合体を提供する必要がある。本明細書中で使用する用語「コラーゲン」とは、いずれかの原料に由来の全てのタイプのコラーゲンを包含することを意図し

ており、これには、組織から抽出するか組換え的に生産したコラーゲン、コラーゲン類似物、コラーゲン誘導体、改質したコラーゲン、および変性したコラーゲン(例えば、ゼラチン)が含まれるが、これらに限定されない。

【0045】コラーゲンは、動物の骨、軟骨、皮膚および結合組織の主要なタンパク質成分である。天然形状のコラーゲンは、典型的には、約300ナノメートル(nm)の長さおよび1.5 nmの直径の剛性棒状形状の分子である。コラーゲンは、堅い三重らせんを形成する3種のコラーゲンポリペプチドから構成される。これらのコラーゲンポリペプチドは、-Gly-X-Yの繰り返し配列を有する長い中央部分に特徴があり、ここで、XおよびYは、しばしば、「テロペプチド」領域により各末端で結合したプロリンまたはヒドロキシプロリンであり、この「テロペプチド」領域は、この分子の約5パーセント(%)未満を構成する。このコラーゲン鎖のテロペプチド領域は、典型的には、鎖間の架橋およびタンパク質の免疫原性の原因となる。

【0046】本発明の組成物を調製するには、一般に、あらゆる種の原料に由来のコラーゲンが使用され得、例えば、コラーゲンは、ヒトまたは他の哺乳類源(例えば、ウシまたはブタの真皮およびヒト胎盤)から抽出され精製され得るか、または組換えまたは他の方法により、生成され得る。ウシの皮膚からの、精製した実質的に非抗原性コラーゲンの溶液中の調製は、基本的には、1979年2月20日にLuckらに発行された米国特許第4,140,537号、および1984年12月18日にLuckらに発行された米国特許第4,488,911号(これらの内容は、本明細書中で参考として援用されている)に記述されているように、可溶化、酵素処理および精製を含む3段階方法からなる。1992年7月29日出願され特許査定された米国特許出願第07/921,810号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)は、ヒト胎盤からコラーゲンを抽出し精製する方法を開示している。1992年1月18日出願された米国特許出願第08/183,648号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)は、遺伝子導入動物(遺伝子導入ウシを含めて)のミルクにて、ヒト組換えコラーゲンを製造する方法を開示している。本明細書中で使用する用語「コラーゲン」または「コラーゲン物質」とは、全ての形状のコラーゲン(処理したものまたは変性したものを含めて)を意味する。

【0047】I型、II、III型、IV型またはそれらの組み合わせ(これらに限定されないが)を含めたいずれかのタイプのコラーゲンは、使用可能であるが、I型が一般に好ましい。アテロペプチド含有コラーゲンまたはテロペプチド含有コラーゲンのいずれかが使用可能であるが、異種移植源に由来のコラーゲン(例えば、ウシコラーゲン)を用いるときには、アテロペプチドコラーゲンが一般に好ましい。なぜなら、アテロペプチドコラーゲン

は、テロペプチド含有コラーゲンと比較して、その免疫原性が低いからである。

【0048】熱、光照射または化学的架橋剤のような方法であらかじめ架橋されていないコラーゲンは、本発明を実施する際に出発物質として用いるのに好ましいが、あらかじめ架橋したコラーゲンも使用され得る。架橋していないアテロペプチド繊維状コラーゲンは、それぞれ、35 mq/mlおよび65 mq/mlのコラーゲン濃度で、Zyderm(登録商標) I CollagenおよびZyderm II Collagenの商標で、Collagen Corporation(Palo Alto, CA)から市販されている。グルタルアルデヒドで架橋したアテロペ

プチド繊維状コラーゲンは、35 mq/mlのコラーゲン濃度で、Zyplast(登録商標) Collagenの商標で、Collagen Corporationから市販されている。

【0049】本発明で使用するコラーゲンは、一般に、約20 mq/mlと約120 mq/mlの間の濃度、好ましくは、約30 mq/mlと約90 mq/mlの間の濃度で、水性懸濁液中に存在する。

【0050】非繊維状コラーゲンは、本発明を実施する際に使用するのに好ましい。なぜなら、非繊維状コラーゲンは、粘稠性があり、一般に、(一定の同一コラーゲンタンパク質濃度で)、繊維状コラーゲンよりも粘性が高く、生体粘着剤として使用することを意図した組成物には、特に有用であるからである。用語「非繊維状コラーゲン」とは、コラーゲンの水性懸濁液の光学的な透明性により示されるように、pH7で実質的に非繊維形状のいずれかの変性コラーゲン物質または非変性コラーゲン物質を意味する。

【0051】本発明の生体粘着剤組成物で使用するコラーゲンは、典型的には、最初は繊維形状で開始し、次いで、1種またはそれ以上の繊維分解剤の添加により、非

用される用語「非繊維状コラーゲン」とは、天然形状で非繊維状のタイプのコラーゲン、および中性またはほぼ中性のpHで非繊維形状であるように化学的に変性したコラーゲンを包含することを意図している。天然形状で非繊維状(または微細繊維状)であるタイプのコラーゲンには、IV型、VI型およびVII型が含まれる。

【0053】中性のpHで非繊維形状であるように化学的に変性したコラーゲンには、スクシニル化コラーゲンおよびメチル化コラーゲンが含まれ、共に、1979年8月14日にMiyataらに発行された米国特許第4,164,559号(その内容は、全体として本明細書中で参考として援用されている)に記載の方法に従って、調製され得る。本発明者らの実験により、メチル化コラーゲンは、その固有の粘着性のために、生体粘着性組成物で使用するのに特に好ましいことが明らかとなった(以下の実施例3~5を参照)。

【0054】繊維状コラーゲンもまた、本発明の方法で使用され得るが、一般に、非繊維状コラーゲンより不透明で粘着性が低いので、それほど好ましくない。しかしながら、繊維状コラーゲン、または非繊維状コラーゲンおよび繊維状コラーゲンの混合物は、光学的な透明性が必要でないなら、生体内で長期間持続することを意図している粘着剤組成物での使用に好ましいかも知れない。本発明者らは、親水性の合成重合体で架橋したメチル化(非繊維状)コラーゲンおよび繊維状コラーゲンの混合物が、生体粘着剤として有用であることを発見した(以下の実施例5を参照)。

【0055】1994年11月23日にRheeらが出願した米国特許出願第08/344,040号(これは、本願と同じ譲渡人が所有しており、本願出願時に審査中である)に開示されている、微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンおよび架橋していない繊維状コラーゲンの混合物を含有する組成物はまた、本発明を実施する際に使用され得る。この微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンは、好ましくは、グルタルアルデヒドで架橋した繊維状コラーゲンであり、好ましくは、最終組成物の約25重量%~約95重量%、さらに好ましくは、約60重量%~約80重量%を構成する。この架橋していない非繊維状コラーゲンは、好ましくは、最終組成物の約5重量%~約75重量%、さらに好ましくは、約20重量%~約40重量%を構成する。この微粒子状の架橋した繊維状コラーゲンおよび架橋していない繊維状コラーゲンは、まず、配合され、次いで、親水性の合成重合体を用いて、共に架橋される。

【0056】変性コラーゲン(これは、通常、ゼラチンとして知られている)もまた、本発明の方法で有用であることが分かっている。

【0057】本発明のコラーゲンベースの生体粘着剤組成物はまた、組織の癒着または癒着した組織の治癒を促進するために、生体活性剤を含有するように製剤される。本明細書中で使用する用語「生体活性剤」または

10

20

30

40

50

「活性剤」とは、生体内で生体効果を示す有機分子を意味する。活性剤の例には、酵素、受容体アンタゴニストまたはアゴニスト、ホルモン、成長因子、自原性骨髄、抗生物質、抗菌剤および抗体が包含されるが、これらに限定されない。用語「活性剤」はまた、本発明の組成物に混合され得る種々のタイプの細胞を包含することを意図している。用語「活性剤」はまた、上で定義した2種またはそれ以上の活性剤の配合物または混合物を包含することを意図している。

【0058】本発明の組成物で使用する好ましい活性剤には、成長因子、例えば、形質転換成長因子(TGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、表皮成長因子(EGF)、結合組織活性化ペプチド(CTAP)、骨原性因子、およびこのような成長因子の生体活性類似物、断片および誘導体が挙げられる。形質転換成長因子(TGF)の超遺伝子ファミリー(これは、多機能性の調節タンパク質である)の構成要素は特に好ましい。TGF超遺伝子ファミリーの構成要素には、 $\beta$ 形質転換成長因子(例えば、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3)；骨形態形成タンパク質(例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9)；ヘパリン結合成長因子(例えば、繊維芽細胞成長因子(FGF)、表皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDGF)、インシュリン様成長因子(IGF)；インヒビン(例えば、インヒビンA、インヒビンB)；成長分化因子(例えば、ODF-1)；およびアクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンB、アクチビンAB)が挙げられる。

【0059】成長因子は、生または天然原料(例えば、哺乳類の細胞)から単離され得るか、または例えば、組換えDNA技術により、または種々の化学方法により、合成的に調製され得る。さらに、これらの因子の類似物、断片または誘導体は、その天然分子の生体活性の少なくとも一部を示すという条件で、使用され得る。例えば、部位特異的な突然変異誘発または他の遺伝子工学技術によって改質した遺伝子の発現により、類似物が調製され得る。

【0060】生体活性剤は、混合により、このコラーゲンに含入され得る。他方、この生体活性剤は、架橋剤(例えば、官能的に活性化したポリエチレングリコール)を用いて、このコラーゲンに共有結合されるか、または結合配位子を用いて、このコラーゲンに親和結合され得る。親水性の合成重合体(例えば、官能的に活性化したポリエチレングリコール)を用いて、生体活性剤(例えば、成長因子)をコラーゲンに共有結合する方法は、1992年11月10日にRheeらに発行された米国特許第5,162,430号(これは、本願と同じ譲渡人に譲渡された)に記載されている。結合配位子(例えば、ヘパリン)によって、生体活性剤をコラーゲンに親和結合する方法は、1995年3月16日にSchroederらが出願した米国特許出願第08/405,320号(これは、本願と同じ譲渡人に所有され、本願出願時

に審査中である)に開示されている。

【0061】生体活性剤は、一般に、コラーゲンを繊維分解剤と混合した後、このコラーゲンに取り入れられる。用いる活性剤の種類および量は、他の因子のうち、処理される特定の部位および状態、および選択した活性剤の生体活性および薬物動態に依存する。

【0062】本発明の組成物に生体活性剤を混合するとき、生体適合性アルコール(特にグリセロール)は、好ましい繊維分解剤である。なぜなら、特定の種の成長因子(例えば、形質転換成長因子 $\beta$ )は、グリセロールを含む組成物にて、その活性を保持することが分かっているからである。

【0063】本発明のコラーゲンベースの生体粘着剤組成物を調製するためには、コラーゲンは、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋される。用語「多官能的に活性化した」とは、他の分子(例えば、コラーゲン)上で求核性基(例えば、第一級アミノ基( $-NH_2$ )またはチオール基( $-SH$ ))と反応できる2個またはそれ以上の官能基(これらは、その重合体鎖に沿った種々の部位に位置している)を有するか、またはそれらを有するように化学的に変性した親水性の合成重合体を意味する。多官能的に活性化した親水性の合成重合体上の各官能基は、コラーゲン分子と共有結合でき、それにより、これらのコラーゲン分子間で架橋が起こる。多官能的に活性化した親水性の合成重合体のタイプには、二官能的に活性化した重合体、四官能的に活性化した重合体、および星形に分枝した重合体が挙げられる。

【0064】多官能的に活性化したポリエチレングリコール(特に、二官能的に活性化したポリエチレングリコール)は、本発明の組成物を調製する際に使用するのに好ましい親水性の合成重合体である。用語「二官能的に活性化した」とは、他の分子(例えば、コラーゲン)上の求核性基と反応できる2個の官能基を有するか、またはそれらを有するように化学的に変性した親水性の合成重合体分子を意味する。二官能的に活性化した親水性の合成重合体上の2個の官能基は、一般に、この重合体鎖の反対の末端に位置している。二官能的に活性化した親水性の合成重合体分子上の官能的に活性化した各基は、コラーゲン分子と共有結合でき、それにより、これらのコラーゲン分子間で架橋が起こる。

【0065】本発明における使用のためには、ポリエチレングリコール(PEG)の分子は、このPEG分子の長さに沿って2個またはそれ以上の部位に官能基を与えるように化学的に変性され、その結果、このPEGとコラーゲン分子上の反応基との間で、共有結合が起こり得る。ある種の活性化した特定形状のPEGは、二官能的に活性化した形状のPEGとコラーゲンを反応させることにより得られる一般化した反応生成物と同様に、構造的に以下に示される。式1～8では、用語COLとは、コラーゲンを表わす；用語PEGとは、繰り返し構造( $-(OCH_2CH_2)_n-$ )を有する

重合体を表わす。

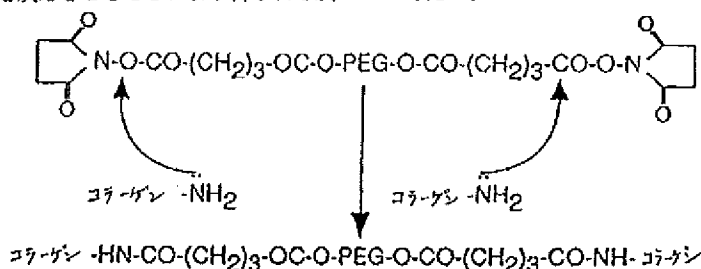
【0066】第一の活性化したPEGは、二官能的に活性化したPEGスクシンイミジルグルタレートであり、本明細書では、(SG-PEG)と呼ぶ。この分子の構造式、およびこれとコラーゲンとを反応させることにより得られる反\*

\* 応生成物を、式1に示す。

【0067】SG-PEG: 二官能的に活性化したPEGスクシンイミジルグルタレート

【0068】

【化1】



【0069】他の二官能的に活性化した形状のPEGは、PEGスクシンイミジル(S-PEG)と呼ばれる。この化合物の構造式、およびそれとコラーゲンとを反応させることにより得られる反応生成物を、式2に示す。この化合物の一般構造式では、添字3は、「n」に置き換えられる。式1で示した実施態様では、このPEGのいずれかの側に3個の繰り返しCH<sub>2</sub>基が存在するという点で、n=3である。

※「エーテル」結合を含む結合物が得られる。これは、式1で示す結合物とは異なっており、式1の結合物では、エステル結合が得られる。このエステル結合は、生理学的な条件下にて、加水分解を受ける。

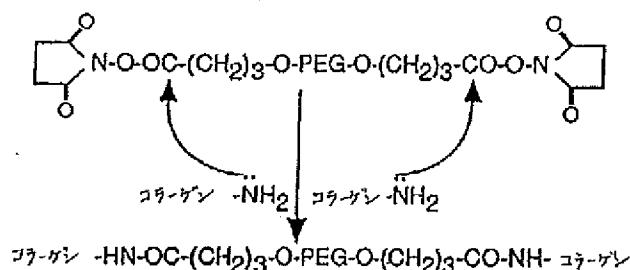
【0071】SE-PEG, n=3: 二官能的に活性化したPEGスクシンイミジル(エーテル結合)

20

【0072】

【化2】

【0070】式2の構造により、加水分解を受けにくい※

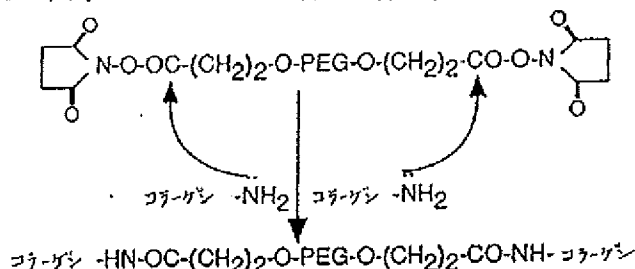


【0073】さらに他の二官能的に活性化した形状のポリエチレングリコール(ここで、n=2)を、この活性化したPEGとコラーゲンとを反応させることにより形成した結合物と同様に、式3に示す。

★【0074】SE-PEG, n=2: 二官能的に活性化したPEGスクシンイミジル(エーテル結合)

【0075】

★【化3】



【0076】n=1のとき、式2および式3の化合物と類似した本発明の他の好ましい実施態様が得られる。その構造式、および得られるコラーゲン-合成重合体結合物を、式4に示す。この結合物は、エーテル結合およびペプチド結合の両方を含有することを記しておく。これ

らの結合は、生理学的な条件下にて、安定である。

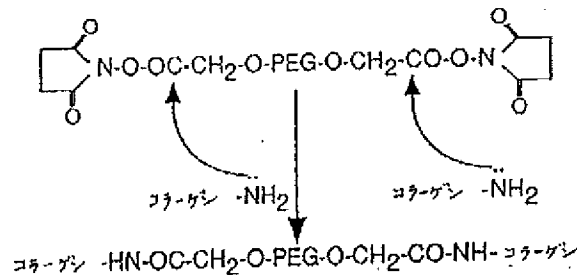
【0077】SE-PEG, n=1: 二官能的に活性化したPEGスクシンイミジル(エーテル結合)

【0078】

【化4】

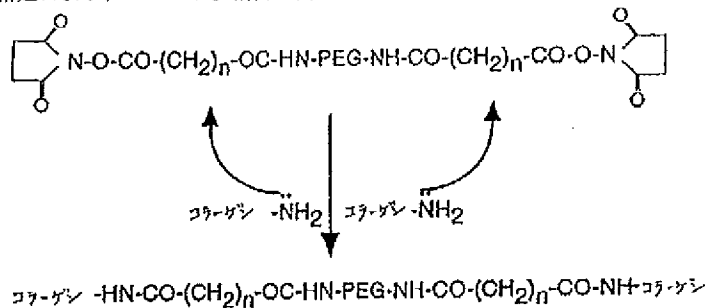
19

20



【0079】他の二官能的に活性化した形状のPEGは、PEGスクシンイミジルスクシンアミド(SSA-PEG)と呼ばれる。この化合物およびそれとコラーゲンを反応させることにより得られる反応生成物の構造式を、式5に示す。式5に示した構造では、 $n=2$ である。しかしながら、関連した化合物(ここで、 $n=1$ または $n=3\sim10$ である)もまた、本発明を実施する際に使用され得る。

【0080】式5の構造により、「アミド」結合を含む\*

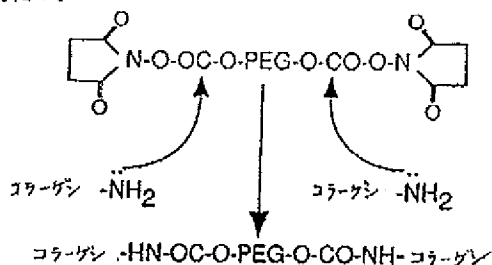


【0083】 $n=0$ のとき、さらに他の二官能的に活性化した形状のPEGが得られる。この化合物は、PEGスクシンイミジルカーボネート(SC-PEG)と呼ばれる。この化合物の構造式、およびSC-PEGとコラーゲンを反応させることにより形成した結合物を、式6に示す。

【0084】SC-PEG、 $n=0$ ：二官能的に活性化したPEGスクシンイミジルカーボネート

【0085】

【化6】



10\* 結合物が得られ、このアミド結合は、先に示したエーテル結合と同様に、加水分解を受けにくく、従って、エステル結合よりも安定である。

【0081】SSA-PEG、 $n=2$ ：二官能的に活性化したPEGスクシンイミジルスクシンアミド

【0082】

【化5】

【0086】式1～6で描いた全ての活性化したポリエチレングリコール誘導体は、スクシンイミジル基を含有する。しかしながら、このPEG分子の長さに沿った部位において、異なる活性基を結合させてもよい。例えば、PEGは誘導体化されて、二官能的に活性化したPEGプロピオンアルデヒド(A-PEG)を形成し得、これは、A-PEGとコラーゲンの反応により形成した結合物と同様に、式7に示す。式6で示す結合は、 $-(CH_2)_n-NH-$ 結合と呼ばれ、ここで、 $n=1\sim10$ である。

【0087】A-PEG：二官能的に活性化したPEGプロピオンアルデヒド

【0088】

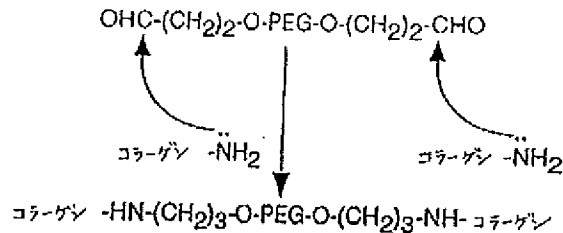
【化7】

40

(12)

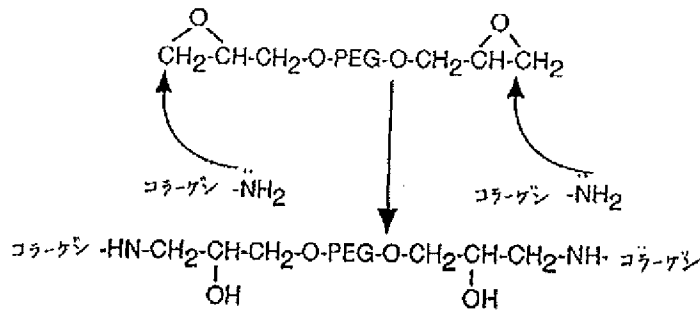
21

22



【0089】さらに他の形状の活性化したポリエチレングリコールは、二官能的に活性化したPEGグリシジルエーテル(E-PEG)であり、これは、これとコラーゲンとを反応させることにより形成した結合物と同様に、式8に示す。

\*【0090】E-PEG：二官能的に活性化したPEGグリシジルエーテル  
【0091】  
【化8】



【0092】上記の活性化した形状のポリエチレングリコールの多くは、現在、Shearwater Polymers (Huntsville, Alabama) および Union Carbide (South Charleston, West Virginia) から市販されている。一定範囲の物理的特性および化学的特性を有するコラーゲン-合成重合体結合物を生成するために使用し得る、種々の活性化した形状のポリエチレングリコールおよび種々の結合は、1994年7月12日に Rhee ちに発行された米国特許第5,328,955号(これは、本願と同じ譲渡人が所有している)に、さらに詳細に記述されている。

【0093】本発明の組成物を調製するのに使用される多官能的に活性化した親水性の合成重合体の濃度は、多くの要因に依存して変えられ、これらの要因には、用いる合成重合体の種類および分子量、およびコラーゲン懸濁液のコラーゲンタンパク質濃度が含まれる。一般に、本発明者らは、最終組成物の約0.1~約10重量%の範囲の合成重合体濃度が、本発明の組成物および方法に使用するのに好ましいことを発見した。例えば、全重量が1グラム(1000ミリグラム)の最終組成物は、約1~約100ミリグラムの間の多官能的に活性化した合成重合体含有する。

【0094】本発明で使用するのに好ましい多官能的に活性化したポリエチレングリコールには、二官能的に活性化したSG-PEG(式1で表わされる)および二官能的に活性化したSE-PEG(式2~4で示される)がある。

【0095】本発明の好ましい生体粘着剤組成物を調製する一般的な方法では、繊維状コラーゲンの水性懸濁液

は、pH7でコラーゲンを実質的に非繊維状にするのに充分な量で、繊維分解剤と混合される。得られた非繊維状コラーゲンは、次いで、このコラーゲンと合成重合体との間で架橋を開始させるために、多官能的に活性化した親水性の合成重合体と混合される。

#### 【0096】使用および適用

第一の表面を第二の表面に結合させる一般的な方法では：1)コラーゲン、および多官能的に活性化した親水性の合成重合体が提供される；2)このコラーゲンおよび合成重合体は共に混合されて、このコラーゲンと合成重合体との間で架橋が開始される；3)このコラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、このコラーゲン-合成重合体の混合物は、第一の表面に適用される；そして4)第一の表面が第二の表面と接触されて、第一の表面と第二の表面との間で癒着が起こる。第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、好ましくは、天然組織の表面である。

【0097】例えば、コラーゲンおよび多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、一般に、別々の注射器に供給され、それらの内容物は、次いで、第一の表面に送達する直前に、注射器-注射器の混合方法を用いて共に混合される。上記のように、コラーゲンは、非繊維状コラーゲンまたは繊維状コラーゲンであり得るが、好ましくは、非繊維状コラーゲンである。非繊維状コラーゲンは、化学的に変性したコラーゲン(例えば、メチル化コラーゲン)；天然状態の非繊維形状または微小繊維形状のコラーゲン(例えば、IV型コラーゲン)；またはpH7で

50

コラーゲンを実質的に非繊維状にするのに充分な量の繊維分解剤と配合した繊維状コラーゲンであり得る。この合成重合体は、一般に、加水分解(これは、典型的には、親水性重合体を水性媒体に晒したときに、起こる)による架橋能力の損失を防止するために、殺菌した乾燥形状で用いられる(このことは、1994年8月8日出願された米国特許出願第08/287,549号(これは、本願と同じ譲渡人に譲渡され、本願出願時に審査中である)に記載されている)。

【0098】コラーゲンおよび合成重合体は、好ましくは、この乾燥重合体とコラーゲンを十分に確実に混合するために、最低で20回(さらに好ましくは、少なくとも30回)のパスで混合される。コラーゲンと合成重合体との間の架橋は、一般に、混合工程中に開始するので、混合後、できるだけ早く、このコラーゲン-合成重合体の反応混合物を第一の表面に送達することが重要である。

【0099】コラーゲン-合成重合体の反応混合物は、注射器または他の適切な押出装置の開口部から、第一の表面に押出され得る。適用に続いて、押出したコラーゲン-合成重合体の反応混合物は、必要であれば、スパチュラを用いて、第一の表面に展開され得る。他方、この非繊維状コラーゲンおよび合成重合体は、適切な混合皿または混合容器で共に混合され、次いで、スパチュラを用いて、第一の表面に適用され得る。

【0100】反応混合物を調製する別の方法では、コラーゲンおよび合成重合体は、ノズル付きの噴霧缶または噴霧瓶または他の適切な噴霧装置の別のチャンバーに入れられる。この状況では、コラーゲンおよび合成重合体は、噴霧装置のノズルから一緒に吹き出されるまで、事実上、混ざらない。

【0101】コラーゲン-合成重合体の反応混合物の適用に続いて、第一の表面が第二の表面と接触される。この2個の表面がこのコラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に接触されるならば、この合成重合体の分子はまた、これらの表面のいずれかまたは両方に存在するコラーゲン分子上のリシン残基と共有結合されて、粘着性が改良される。

【0102】これらの2個の表面は、架橋反応が完結に向けて進行している間、手でまたは他の適切な手段を用いて結合され得る。コラーゲンと合成重合体との間の架橋は、典型的には、このコラーゲンを合成重合体と混合した後、20〜60分間以内に完結する。

【0103】この第一の表面および第二の表面の少なくとも一方は、好ましくは、天然組織の表面である。ここで使用する用語「天然組織」とは、治療される特定の患者の体に備わっている生体組織を意味する。本明細書中で使用する用語「天然組織」とは、患者の体の他の部分に移植するために、同じ患者の体の一部から突出させるかまたは取り出した生体組織(例えば、骨の自己移植

片、皮膚弁の自己移植片など)を含むことを意図している。例えば、本発明の組成物は、火傷患者の場合のように、患者の体の一部に由来の皮膚片を体の他の部分に癒着させるのに、使用され得る。

【0104】他の表面は、天然組織の表面、非天然組織の表面、または合成移植片の表面であり得る。本明細書中で使用する用語「非天然組織」とは、受容患者の体内に移植するために、提供者(受容患者と同じ種または異なる種であり得る)の体から取り出した生体組織を意味する(例えば、組織移植および臓器移植)。例えば、本発明の架橋重合体組成物は、提供者の角膜を受容患者の目に癒着させるのに使用され得る。

【0105】本明細書中で使用する用語「合成移植片」とは、患者の体に移植することを意図したいずれかの生体適合性の物質を意味し、これは、天然組織または非天然組織についての上記定義に包含されない。合成移植片には、例えば、合成の血管、心臓弁、人工臓器、骨補てつ物、移植可能な微小レンズ(lenticules)などが挙げられる。

【0106】本発明の非繊維状コラーゲンベースの生体粘着性組成物は、その光学的な透明性のために、眼科用途での使用に、特に適している。例えば、視力の矯正のための合成の微小レンズは、本発明の方法を用いて、患者の目の角膜のボーマン層に付着され得る。1993年11月3日にRheeらが出願し特許査定された米国特許出願第08/147,227号(これは、本願と同じ譲渡人に譲渡されており、本願の優先権を主張している)に開示されているように、pH7で実質的に非繊維状の化学的に変性したコラーゲン(例えば、スクシニル化コラーゲンまたはメチル化コラーゲン)は、親水性の合成重合体を用いて架橋され、次いで、所望の微小レンズ形状に成形され、そして架橋が完結され得る。得られる架橋したコラーゲン微小レンズは、次いで、本発明の方法を用いて、患者の目の上皮組織を除いた角膜のボーマン層に付着され得る。この非繊維状コラーゲン-合成重合体の反応混合物を角膜の前方表面に適用し、次いで、コラーゲンと合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、この角膜の前方表面を微小レンズの後方表面と接触させることにより、この合成重合体はまた、この角膜組織および微小レンズの両方にて、コラーゲン分子と共有結合して、この微小レンズを一定位置に堅く固定する。(他方、この反応混合物は、まず、この微小レンズの後方表面に適用され、次いで、この角膜の前方表面と接触してもよい)。

【0107】共に、求核性基(例えば、第一級アミノ基( $-NH_2$ )またはチオール基( $-SH$ ))を含む2個の表面間で癒着を起こす別の方法では、多官能的に活性化した親水性の合成重合体が第一の表面に適用され、次いで、第二の表面が第一の表面と接触される。この多官能的に活性化した親水性の合成重合体は、第一の表面および第二の表面の両方の求核性基と共有結合して、この2個の表面

の間で癒着を起こす。

【0108】この合成重合体は、水溶液(例えば、水またはリン酸緩衝溶液(PBS))中に存在するか、または非水性溶液(例えば、生体適合性のオイル)中に存在し得る。溶液中の合成重合体の濃度は、好ましくは、溶液1ミリリットルあたり、約10〜約400ミリigramの合成重合体の範囲内である。水溶液が用いられるとき、この合成重合体は、好ましくは、この合成重合体の加水分解による粘着性の損失を防止するために、癒着を必要とする表面に適用する直前に、水性溶媒と混合される。

【0109】他方、この多官能的に活性化した合成重合体は、乾燥形状で使用され得る。殺菌した乾燥形状の、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を調製する方法は、1995年6月30日出願された米国特許出願第08/497,573号(これは、本願と同じ譲渡人に譲渡され、本願出願時に審査中である)に示されている。例えば、この乾燥した合成重合体は、薄いシートまたは膜に圧縮成形され、これは、次いで、 $\gamma$ 線照射、または好ましくは、電子線照射を用いて、殺菌され得る。得られる乾燥した膜またはシートは、所望のサイズに切断され、次いで、

上記方法で用いる第一の表面に適用されて、2個の表面間で癒着が起こる。

【0110】本発明の組成物はまた、外科手術または負傷後に、内部の組織または器官に癒着が形成されるのを防止するために、組織を被覆するのに使用され得る。外科手術後の癒着の形成を防止するために組織を被覆する一般的な方法では、このコラーゲンおよび多官能的に活性化した親水性の合成重合体が混合され、次いで、このコラーゲンと多官能的に活性化した親水性の合成重合体との間で実質的な架橋が起こる前に、この反応混合物の薄層は、外科手術部位を含む組織、それを取り囲む組織またはそれに隣接する組織に適用される。この反応混合物の組織部位への適用は、押出、はけ塗り、噴霧(上記のように)、または他のいずれかの好都合な手段により、行われ得る。

【0111】この反応混合物の外科手術部位への適用に続いて、外科切開部位の閉鎖の前に、その場で架橋が続けられる。一旦、このコラーゲンと多官能的に活性化した合成重合体との間で「平衡的な」(すなわち、完全な)架橋が起こると、本発明の組成物で被覆された組織に接

触している組織は、この被覆組織には付着しない。この時点で、この外科手術部位は、通常方法(縫合など)を用いて閉鎖され得る。

【0112】平衡的な架橋が達成される時点は、本明細書では、この組成物が、ねばねばした触感がもはや感じられない時点として定義される。一般に、比較的短時間(すなわち、このコラーゲンと合成重合体との混合後、5〜15分間)以内に完全に架橋される組成物は、外科手術の癒着の防止に使用するのに好ましく、その結果、その外科手術部位は、この外科手術手順が完了した

後、比較的早く閉鎖され得る。

【0113】米国特許出願第( )号(代理人整理番号: 94-021; これは、本願と同じ譲渡人に譲渡され、本願出願時に審査中であり、その内容は、本明細書中で参考として援用されている)に記述のように、本発明の組成物は、哺乳類被検体の体内の種々の管腔または空孔を遮断または充填するのに使用され得る。この組成物はまた、組織または構造(例えば、血管)の内部にて、裂溝を密封する生体封鎖剤として、または血液または他の生体液体の漏出を防止するための、隣接組織または構造間の接合部として使用され得る。

【0114】

【実施例】以下の実施例は、本発明の結合物、組成物および装置の好ましい実施態様をいかに作成するかの完全な開示および記述を、当業者に提供するために提示しており、本発明者らが本発明と見なす範囲を限定することを意図していない。使用する数値(例えば、量、温度、分子量など)に関して、正確を期すべく努力がなされているが、ある程度の実験誤差および偏差は、考慮すべきである。他に指示がなければ、部は重量部であり、分子量は数平均分子量であり、温度は摂氏であり、そして圧力は大気圧またはそれに近い。

#### 【0115】実施例1

(PEGで架橋したスクシニル化コラーゲンの調製)溶液中コラーゲン(CIS)(pH2のHCl中の3 mg/mlのコラーゲン)8リットルを、室温にて0.1 MのNaOHを用いて、pH 9まで調整して、繊維状コラーゲンを生成した。この繊維状コラーゲンに、無水コハク酸粉末1.35グラムを加え、そのpHを8.5と9の間に維持して、スクシニル化コラーゲンを形成した。このスクシニル化コラーゲンのpHを7.2に調整し、次いで、0.1 MのHClを用いて、4.2に調整して、このスクシニル化コラーゲンを沈殿させた。このスクシニル化コラーゲンを、次いで、遠心分離し、その上清を捨てた。そのペレットのpHを、0.1 MのNaOHを用いて、7.2に調整した。このスクシニル化コラーゲンペレットを水で希釈し、得られたスクシニル化コラーゲン溶液のコラーゲン濃度を20 mg/mlと決定した。

【0116】二官能的に活性化したSG-PEG(3800MW)のPBS溶液を、以下のような異なる濃度で調製した: 0.1 mlのPBS中の10 mgのSG-PEG, 0.1 mlのPBS中の20 mgのSG-PEG, 0.1 mlのPBS中の50 mgのSG-PEG, および0.2 mlのPBS中の100 mgのSG-PEG。4つの架橋剤溶液のそれぞれを、注射器-注射器混合を用いて、0.9 mlの20 mg/mlスクシニル化コラーゲンと混合した。この4個のスクシニル化コラーゲン-SG-PEG組成物は、それぞれ、10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/mlおよび91 mg/mlの最終SG-PEG濃度を有していた。これらの試料の最終コラーゲン濃度は、約18 mg/mlであった。

【0117】これらの4つの調製物を、混合後5分および2時間の時点で、架橋の徴候について、目視観察し

た。表1に示すように、50 mq/mlおよび91 mq/mlのSG-PEGを含有するスクシニル化コラーゲン調製物は、混合後5分で架橋の徴候を示した。4個の調製物の全ては、混合後2時間で、著しい架橋を示し、光学的に透明なゲル\*

SG-PEG (mg)	PEG (ml)	スクシニル化コラーゲンのPEG架橋		架橋の徴候 (2時間)	最終SG-PEG 濃度(mg/ml)
		スクシニル化 コラーゲン(ml)	架橋の徴候 (5分)		
10	0.1	0.9	なし	有り	10
20	0.1	0.9	なし	有り	20
50	0.1	0.9	ある程度の徴候	有り	50
100	0.2	0.9	ある程度の徴候	有り	91

【0119】10 mq/ml、20 mq/ml、50 mq/mlおよび91 mq/mlのSG-PEGを含有するスクシニル化コラーゲン調製物(それぞれ、試料B、CおよびD)の融解温度を、示差走査熱量測定(DSC)を用いて測定し、架橋していないスクシニル化コラーゲン(試料A)の融解温度と比較した。DSCは、ゲル安定性を評価するために通常使用される架橋度の尺度である。

【0120】DSCの結果を図1に示す。架橋した調製物(B、CおよびD)の融解温度は、架橋していないスクシニル化コラーゲン(A)の融解温度より、著しく高かった。

#### 【0121】実施例2

(PEGで架橋したメチル化コラーゲンの調製)リドカインなしのZyderm(登録商標) II Collagen(Collagen Corporation, Palo Alto, CA)90ミリリットル(これは、20 mq/mlのコラーゲン濃度まで調整した)を凍結乾燥して、凍結乾燥コラーゲンを形成した。この凍結乾燥コラーゲンを、次いで、小さな部分に切断した。

【0122】濃塩酸8.3ミリリットルおよび硫酸ナトリウム30グラムをメタノールに加えて、無水の酸性メタノールを生成した。この無水の酸性メタノールから、次いで、硫酸ナトリウムを濾過して取り除いた。約1リットルの酸性化した無水のメタノールを、引き続いて、この切断した凍結乾燥コラーゲンと混合した。

【0123】室温で7日間インキュベーションした後、メチル化コラーゲンを形成した。過剰のメタノールを蒸発させて除いた。得られた物質を、引き続いて、凍結乾燥し、透析し、そして0.02 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /0.13 M NaCl(pH 7.3)を添加することにより、そのコラーゲン濃度を20 mq/mlに調整した。

【0124】二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)のPBS溶液を、以下のような異なる濃度で調製した: 0.15 mlのPBS中の3 mqのSG-PEG、0.15 mlのPBS中の9 mqのSG-PEG、0.15 mlのPBS中の15 mqのSG-PEG、0.15 mlのPBS中の30 mqのSG-PEG、0.15 mlのPBS中の45 mqのSG-PEG、0.15 mlのPBS中の75 mqのSG-PEG、0.2 mlのPBS中の111 mqのSG-PEG、および0.2 mlのPBS中の165 mqのSG-PEG。

\*を形成した。

【0118】

【表1】

これらの架橋剤溶液のそれぞれを、注射器-注射器混合を用いて、1.35 mlの20 mq/mlメチル化コラーゲンと混合した。これらのメチル化コラーゲン-SG-PEG組成物は、それぞれ、2 mq/ml、6 mq/ml、10 mq/ml、20 mq/ml、30 mq/ml、50 mq/ml、72 mq/mlおよび106 mq/mlの最終SG-PEG濃度を有していた。これらの試料の最終コラーゲン濃度は、約18 mq/mlであった。

【0125】得られた調製物の可塑性およびゲル強度について、定性分析した。表2に示すように、30 mq/mlおよび50 mq/mlのSG-PEGを含有する調製物は、混合後すぐに、架橋の徴候を示した。2 mq/ml、6 mq/ml、10 mq/mlおよび20 mq/mlのSG-PEGを含有する組成物は、架橋に5~10分間を要した。72 mq/mlおよび106 mq/mlのSG-PEGを含有する組成物は、ゲル形成に10分間より長い時間を要し、弱い非可塑性のゲルを形成した。2~20 mq/mlのSG-PEGを含有する組成物からは、最も強く最も可塑性のあるゲルが得られた。30 mq/mlのSG-PEGを含有する組成物は、強度は良好であるが可塑性の低いゲルを形成し、このゲルは、可塑性が好ましい特性ではない用途に有用であり得る。30 mq/mlより多いSG-PEGを含有するメチル化コラーゲンの組成物は、可塑性およびゲル強度に乏しかった。全てのゲルは、光学的に透明であった。

【0126】2 mq/ml、10 mq/ml、30 mq/mlおよび72 mq/mlのSG-PEGを含有するメチル化コラーゲン調製物(それぞれ、試料E、F、GおよびH)の融解温度を、示差走査熱量測定(DSC)を用いて測定し、そして架橋していないメチル化コラーゲンの融解温度と比較した。これらの架橋していない試料および架橋した試料のDSC結果を、それぞれ、図2および図3に示した。融解曲線の輪郭は、架橋した調製物が不均質な分子集団を含むことを示しており、これらの分子のほとんどは、架橋していないコラーゲンよりも高い温度で融解する。

【0127】表2に示すように、架橋した調製物の融解温度は、架橋していないメチル化コラーゲンの融解温度よりも著しく高かった。

【0128】

【表2】

20 mg/mlのメチル化コラーゲンのPEG架橋				
最終SG-PEG 濃度(mg/ml)	ゲル化ま での時間	可塑性	ゲル強度	DSCのT <sub>m</sub> (°C)範囲
0	—	—	—	38~43
2	5~10分間	可塑性	良好	45~60
6	5~10分間	可塑性	良好	—
10	5~10分間	非常に可塑性	非常に良好	45~68
20	5分間	僅かに可塑性	良好	—
30	すぐ	可塑性なし	良好	47~62
50	すぐ	僅かに可塑性	不良	—
72	10分間以内	可塑性なし	不良	40~70
106	10分間以内	可塑性なし	不良	—

### 【0129】実施例3

(その場で重合可能な微小レンズのウシ角膜への生体内送達および付着) 30 mg/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲンを、実施例2に記述のようにして調製した。切開したウシの目の角膜の上皮層を、先の丸い金属製スパチュラを用いて除去した。上皮を剥離した後、この角膜をPBSで洗浄し、そしてスポンジを用いて完全に乾燥した。

【0130】10 mgの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)の0.1 mlのPBSの溶液を調製した。この架橋剤溶液を、注射器—注射器混合を用いて、0.9 mlの30 mg/mlメチル化コラーゲンと混合した。混合後すぐに、約0.2 mlのメチル化コラーゲン—SG-PEG物質を、1.0 ccの注射器の開口部から、上皮剥離したウシ角膜の表面に押出した。

【0131】このメチル化コラーゲン—SG-PEG物質を、ポリメチルメタクリレート(PMMA)またはポリスルホンの型を用いて、この角膜上の一定位置で成形した。約3分間以内に、このコラーゲン—重合体の架橋およびゲル形成が起こり、ウシ角膜上のその場で微小レンズを形成した。

【0132】ゲル形成に続いて、この型を、このコラーゲン—重合体物質から取り除いた。その場で形成した微小レンズの表面を、PBSで灌注した。この微小レンズは固定化されており、この灌注によっても移動しなかった。この微小レンズをスパチュラで穏やかに掻き裂いたところ、この微小レンズは、この角膜にうまく付着していることが分かった。この微小レンズは、スパチュラで「剥離」することにより、除去できた。

【0133】このメチル化コラーゲン—SG-PEG微小レンズの除去前および除去後のウシ角膜上について、組織学的な検査(100倍の倍率)を行った。微小レンズの除去前の組織学的な検査では、この微小レンズと角膜との間の密接な界面が示された。この微小レンズを除去した後も、この角膜の表面には、明らかな損傷または異常は認められなかった。

【0134】36%レベルのスクシニル化および30 mg/mlのコラーゲン濃度のスクシニル化コラーゲンから調製した物質を用いて、上記実験を繰り返した。20ミリグラムの二官能的に活性化したSG-PEGを、0.1 mlのPBSに溶解

した。この架橋剤溶液を、引き続いて、注射器—注射器混合を用いて、0.9 mgの30 mg/mlスクシニル化コラーゲンと混合し、次いで、上皮剥離したウシ角膜に分配した。このコラーゲン—重合体物質の角膜への送達に続いて、約10分間以内に、ゲルの形成が起こった。定性的な比較により、このメチル化コラーゲン—SG-PEG物質は、このスクシニル化コラーゲン—SG-PEG物質よりも良好に角膜に付着していることが明らかとなった。

### 【0135】実施例4

(PEGで架橋したメチル化コラーゲンの生体粘着剤としての使用)メチル化コラーゲン(種々のコラーゲン濃度)および種々の濃度の二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)を用いて、以下の調製物を調製した。これらの調製物を、あらかじめ屠殺した(sacrificed)ウサギの出血した傷口部位への癒着について、定性評価した。

【0136】調製物A: 33 mg/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲン(これは、実施例1に記述のように調製した)900マイクロリットル( $\mu$ l)を、150 $\mu$ lのPBS(リン酸緩衝溶液)中で、約13.5 mgの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と混合した(SG-PEGとコラーゲンとの40:1のモル比)。この物質を、あらかじめ屠殺したウサギの肝臓上の出血した傷口部位に押出し、1分間ゲル化させた。次いで、その皮膚をゲルの上部に置き、一定位置で1分間保持した。この皮膚を除去し、このゲルの状態を検査した。このメチル化コラーゲン—SG-PEGのゲルは、この肝臓に非常に良好に癒着したが、皮膚にはよく癒着しなかった。

【0137】調製物B: 33 mg/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲン900マイクロリットル( $\mu$ l)を、150 $\mu$ lのPBS中において、約27 mgの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と混合した(SG-PEGとコラーゲンとの80:1のモル比)。この物質を、あらかじめ屠殺したウサギの筋肉上の出血した傷口部位に押出し、1分間ゲル化させた。その皮膚を、次いで、このゲルの上部に置き、一定位置で1分間保持した。この皮膚を除去し、このゲルの状態を検査した。このメチル化コラーゲン—SG-PEGのゲルは、この傷口部位に非常に良好に癒着したが、皮膚にはよく癒着しなかった。

【0138】調製物C: 64 mg/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲン4.5ミリリットル(ml)を、0.5 m

17のPBS中において、約325 mqの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と混合した(SG-PEGとコラーゲンとの100:1のモル比)。この物質を、あらかじめ屠殺したウサギの出血した傷口部位に押出し、1分間ゲル化させた。その皮膚を、次いで、このゲルの上部に置き、一定位置で1分間保持した。この皮膚を除去し、このゲルの状態を検査した。このメチル化コラーゲン-SG-PEGのゲルは、この傷口部位に非常に良好に癒着したが、皮膚にはよく癒着しなかった。

【0139】調製物D: 35 mq/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲン1.8ミリリットル(ml)を、250μlのPBS中において、71.4 mqの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と混合した(SG-PEGとコラーゲンとの100:1のモル比)。この物質を、注射器間の物質を30回パスする注射器-注射器混合を用いて混合し、次いで、あらかじめ屠殺したウサギの出血した傷口部位に押出した。すぐに、SG-PEGとコラーゲンとを2:1のモル比で含むコラーゲン-SG-PEG膜(およそ直径: 4.5 cm)を、この押出したSG-PEG-コラーゲン物質の上部に置き、これを1分間ゲル化させた。その皮膚を、次いで、この膜の上部に置き、一定位置で1分間保持した。この皮膚を除去し、このゲルおよび膜の状態を検査した。このメチル化コラーゲン-SG-PEGのゲルは、この傷口部位および膜に非常に良好に癒着した。

【0140】調製物E: 35 mq/mlのコラーゲン濃度を有するメチル化コラーゲン1.8ミリリットル(ml)を、250μlのPBS中において、71.4 mqの二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と混合した(SG-PEGとコラーゲンとの100:1のモル比)。この物質を、注射器間で物質を30回パスする注射器-注射器混合を用いて混合し、次いで、あらかじめ屠殺したウサギの出血した傷口部位に押出し、次いで、1分間ゲル化させた。その皮膚を、次いで、このゲルの上部に置き、一定位置で1分間保持した。この皮膚を除去し、このゲルの状態を検査した。このメチル化コラーゲン-SG-PEGのゲルは、この傷口部位に非常に良好に癒着したが、皮膚にはよく癒着しなかった。

#### 【0141】実施例5

(PEGで架橋したメチル化コラーゲンおよび繊維状コラー

#### 二官能的に活性化したSG-PEGを用いて架橋したメチル化コラーゲン および繊維状コラーゲンの混合物を含有する生体粘着性調製物

繊維状コラーゲン(g)	メチル化コラーゲン(g)	繊維状コラーゲン%(w/w)
0.72	0.18	80
0.63	0.27	70
0.54	0.36	60
0.45	0.45	50
0.36	0.54	40
0.27	0.63	30

【0148】これらの6個の調製物のそれぞれを、上皮剥離したウシの目に適用した。これらの調製物の全ては、上皮剥離した目に良好に癒着した。しかしながら、この調製物のメチル化コラーゲン含量が増えるにつれて

\* ゲンの混合物を含有する生体粘着剤調製物)PEGで架橋した繊維状コラーゲンのウシの目(Ferara Meats, Santa Clara, CAから得た)への癒着を評価するために、以下の実験を行った。これらの実験は、屠殺した動物から目を採取した後、24時間以内に行った。これらの目は、PBSで洗浄しすすいだ。

【0142】3つの目の上皮を剥離し、PBSで洗浄し、次いで、乾燥した。以下のようにして、3個の調製物を評価した: 繊維状コラーゲン(68 mq/mlのコラーゲン濃度)を、二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)と、SG-PEGとコラーゲンとの20:1のモル比で混合し、すぐに、上皮剥離した目に適用した。

【0143】繊維状コラーゲン(68 mq/mlのコラーゲン濃度)を、二官能的に活性化したSG-PEGと、SG-PEGとコラーゲンとの20:1のモル比で混合し、この調製物を遠心分離して、気泡を除去し、次いで、混合後約2分間で、上皮剥離した目に適用した。

【0144】メチル化コラーゲン(37.2 mq/mlのコラーゲン濃度)を、二官能的に活性化したSG-PEGと、SG-PEGとコラーゲンとの20:1のモル比で混合し、すぐに、上皮剥離した目に適用した。繊維状コラーゲン(68 mq/mlのコラーゲン濃度)を、二官能的に活性化したSG-PEGと、SG-PEGとコラーゲンとの20:1のモル比で混合し、すぐに、このメチル化コラーゲン-SG-PEG調製物の上部に適用した。

【0145】室温で2時間後、このコラーゲン-SG-PEG調製物の目への付着を定性評価した。繊維状コラーゲンおよびSG-PEGを含有する組成物は、上皮剥離した目への付着がないことが分かった。メチル化コラーゲンおよびSG-PEGを含有する組成物は、この上皮剥離した目に非常によく癒着することが分かった。

【0146】繊維状コラーゲン(37.2 mq/mlのコラーゲン濃度)とメチル化コラーゲン(37.2mq/mlのコラーゲン濃度)とを混合し、次いで、0.4%(重量/容量)の二官能的に活性化したSG-PEG(3800 MW)を用いて架橋することにより、以下の表3で示す調製物を調製した。

#### 【0147】

【表3】

(すなわち、繊維状コラーゲン含量が減るにつれて)、付着強度が上がるということが分かった。

#### 【0149】実施例6

(種々のコラーゲンベースの調製物の生体内癒着)あらか

じめ屠殺したブタの膀胱を切開し、以下の表4に示す種々のコラーゲンベースの調製物の各0.2 ccを、1 ccの注射器から、27ゲージの注射針を通して、その膀胱内壁に注射した。ブタ膀胱を、次いで、組織の湿潤を保持するために、湿ったタオルで覆い、37°Cで約1時間インキュベートした。

\*

種々のコラーゲンベースの調製物のブタ膀胱壁への付着

物 質	ゲル 形成	組織へ の付着
Zyplast(登録商標) I Collagen(グルタルアルデヒドで架橋した繊維状コラーゲン、35 mg/mlのコラーゲン濃度)	なし	なし
Zyplast II Collagen(グルタルアルデヒドで架橋した繊維状コラーゲン、85 mg/mlのコラーゲン濃度)	なし	なし
Zydera(登録商標) I Collagen(架橋していない繊維状コラーゲン、35 mg/mlのコラーゲン濃度)	堅いゲル	強い
0.3%(w/v)DSB-PEG*で架橋したZyplast I CollagenおよびZydera I Collagenの70:30(w/w)混合物	堅いゲル	強い
0.3%(w/v)DSB-PEG*で架橋したメチル化コラーゲン(架橋していない非繊維状コラーゲン、35 mg/mlのコラーゲン濃度)	軟らかいゲル	弱い

\* DSB-PEG=二官能的に活性化したSB-PEG、3800 MW

【0152】これらのPEG架橋した調製物の全ては、組織への付着を示したが、繊維状コラーゲンを含有するPEG架橋調製物は、PEG架橋した非繊維状(メチル化)コラーゲン調製物よりも強い付着を示し、このことは、この実験で用いたDSB-PEGとメチル化コラーゲンとの比が最適ではないことを示している。

## 【0153】実施例7

(コラーゲンベースの生体粘着剤組成物の調製)グリセロール(Sigma St. Louis, MOから得た)1ミリリットルを、殺菌のためにオートクレーブにかけた。1 mlのZyderm(登録商標) II Collagen(65 mg/mlのコラーゲンタンパク質濃度、Collagen Corporation, Palo Alto, CAから得た)を含む3 ccの注射器を、三路ストップコックを介して、グリセロールを含む注射器に取り付けた。このグリセロールおよびコラーゲンを、次いで、注射器-注射器混合を用いて、約100回のパスで混合した。

【0154】スクロース(Sigma, St. Louis, MOから得た)1グラムを、舟形秤(weigh boat)に入れて重量を計った。舟形秤において、このスクロースに、1ミリリットルのZyderm II Collagenを加えた。このスクロースおよびコラーゲンを、コラーゲンが透明になるまで、混合した。このコラーゲ

\*【0150】移植片の上部表面を覆っている組織を切開して、この移植片を暴露した。各移植片の下部組織への付着を、以下の表4に示すように、定性評価した。

【0151】

【表4】

20 ンスクロース混合物を、3 ccの注射器に充填した。  
【0155】これらのグリセロール-コラーゲン混合物およびスクロース-コラーゲン混合物を、次いで、注射器-注射器の混合を用いて、種々の量の殺菌し乾燥し二官能的に活性化したSG-PEG(DSG-PEG、3800 MW;これは、3 ccの注射器内に含有されている)と混合した。このコラーゲン調製物およびDSG-PEGを十分に混合したとき、得られた組成物を表面に押出し、次いで、第二の表面と接触させて、2個の表面間で癒着させることができる。

## 【0156】実施例8

(コラーゲンベースの生体粘着剤組成物の特性付け)上記の実施例に記述の方法に従って、表5で挙げた調製物を調製し、癒着特性(すなわち、粘稠性)および形状(すなわち、取扱性)を定性評価した。これらの調製物を、0~3の尺度で評点し、3の評点は、その調製物が非常に粘稠であるかまたは良好な形状を有することを示し、0の評点は、その調製物が粘稠性または形状に乏しいことを示す。

【0157】

【表5】

40

コラーゲンベースの生体粘着剤調製物の特性付け

調製物	温度		コラーゲン		DSG-PEG		形状
	(°C)	pH	濃度(mg/ml)	濃度(重量%)	癒着	癒着	
DC/DSG-PEG	>40	7	100~150	1	2	2	2
DC/DSG-PEG	>40	7	100~150	0.1	2	2	2
KC/DSG-PEG	20	7	80	1	1	1	1
KC/DSG-PEG	20	7	80	0.1	2	2	2
KC/DSG-PEG	>40	7	60	1	1	1	1
KC/DSG-PEG	>40	7	60	0.1	2	3	3
SC/DSG-PEG	20	7	50	1	3	3	3
GC/DSG-PEG	20	7	65	1	3	3	3
GC/DSG-PEG	20	7	65	0.1	3	3	3
GC/DSG-PEG	20	7	35	1	3	3	3
GC/DSG-PEG	20	7	35	0.1	3	3	3

DC=変性コラーゲン(すなわち、ゼラチン)

KC=メチル化コラーゲン

SC=スクロース/コラーゲン

GC=グリセロール/コラーゲン

【0158】これらのスクロース/コラーゲン/DSG-PEG調製物およびグリセロール/コラーゲン/DSG-PEG調製物の全ては、優れた癒着特性および取扱い性を示した。このメチル化コラーゲン/DSG-PEG調製物は、それほど良好な癒着特性および取扱い性を示さず、このことは、この実験で用いたDSG-PEGとメチル化コラーゲンとの比が最適ではないことを示している。

#### 【0159】実施例9

(上皮剥離したウサギの角膜における二官能的に活性化したSE-PEG溶液の生体粘着剤としての生体内評価)以下の方法に従って、あらかじめ形成した微小レンズを調製した：メチル化コラーゲン(53 mg/mlのコラーゲン濃度)を、40 mgの二官能的に活性化したSG-PEG(DSG-PEG, 3800 MW, Shearwater Polymers, Huntsville, ALから得た)と混合し、約250μmの厚さの湾曲した薄膜に形成した。この薄膜から、直径7~8 mmの円形の微小レンズを切り取った。これらの微小レンズを、2 mlのPBSまたは2 mlの0.2%グルタルアルデヒド中に80 mgのDSG-PEGを含有する溶液に入れ、一晚インキュベートさせた。

【0160】数匹の雄のニュージーランド産の白ウサギの角膜を、ジル(q111)ナイフを用いて上皮剥離した。200μlのPBS中に40 mgの二官能的に活性化したSE-PEG(DSE-PEG, 3800 MW, Shearwater Polymers, Huntsville, ALから得た)を含有する溶液を、上記のように調製しあらかじめ形成した微小レンズの凹形部分に適用した。2分間以内に、過剰のDSE-PEG溶液をピペットを用いて吸引した。あらかじめ形成したコラーゲン微小レンズを、次いで、この上皮剥離した角膜の表面にすぐに適用した。

【0161】このあらかじめ形成した微小レンズは、DSE-PEG「粘着剤」を有する上皮剥離した角膜組織によく癒着することが分かった。これらの微小レンズは、ジルナイフを用いた穏やかな操作により、容易に除去できた。

#### 【0162】実施例10

(上皮剥離したウサギの角膜における二官能的に活性化

したSE-PEGの粘着剤としての生体内評価)数匹の雄のニュージーランド産の白ウサギの角膜を、ジルナイフを用いて上皮剥離した。200μlのPBS中に40 mg、53 mgまたは66 mgの二官能的に活性化したSE-PEG(DSE-PEG, 3800 MW, Shearwater Polymers, Huntsville, ALから得た)を含有する溶液を、この上皮剥離したウサギ角膜の凹形部分に適用した。2分間以内に、過剰のDSE-PEG溶液をピペットを用いて吸引した。あらかじめ形成したコラーゲン微小レンズ(Imedex, Lyon, Franceから得た)を、次いで、この上皮剥離した角膜の表面にすぐに適用した。

【0163】このあらかじめ形成した微小レンズは、DSE-PEG「粘着剤」を有する上皮剥離した角膜組織によく癒着することが分かった。これらの微小レンズは、ジルナイフを用いた穏やかな操作により、容易に除去できた。

【0164】7日後、53 mg/mlのDSE-PEG溶液を用いてウサギ角膜に癒着した微小レンズを観察した。この特定の微小レンズの中心部は、角膜に対して、良好な付着性を有することが分かった。しかしながら、この微小レンズの端部は、この角膜に堅く癒着していなかった。この角膜の中心部は、僅かに不透明であることが認められた。この微小レンズと角膜との間に、タンパク質沈殿物が存在し得、このDSE-PEGは、沈殿したタンパク質に共有結合して、この角膜の表面の一定位置で保持している結果、目の中心部で不透明性が認められたと考えられる。

#### 【0165】実施例11

(上皮剥離した霊長類の角膜における二官能的に活性化したSE-PEG溶液の粘着剤としての生体内評価)マカクサル(Macaca cynomolgus)の角膜を、ジルナイフを用いて上皮剥離した。PBS中に40 mgの二官能的に活性化したSE-PEG(DSE-PEG, 3800 MW, Shearwater Polymers, Huntsville, ALから得た)を含有する溶液を、あらかじめ形成したコラーゲンの微小レンズ(Imedex, Lyon, Franceから得た)の凹形部分に適用した。2分間以内に、過剰

のDSE-PEG溶液をピペットを用いて吸引した。このあらかじめ形成したコラーゲンの微小レンズを、次いで、上皮剥離した角膜組織の表面にすぐに適用した。

【0166】3週間後、この微小レンズは、このサルのコラ膜に堅く付着していることが分かった。角膜の不透明性は認められなかった。この操作に続いた第1週では、最小限度の炎症しか認められなかった。しかしながら、この炎症は、2週目までに沈静した。

【0167】

【発明の効果】組織癒着または合成移植材料への組織の癒着に有用なコラーゲンベースの組成物が開示されている。この組成物は多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋したコラーゲンを含む。特に好ましい組成物は、繊維状コラーゲン、繊維分解剤および多官能的に活性化した親水性の合成重合体を含む。この組成物を用いて、天然組織を他の天然組織、非天然組織または合成移植片に付着させる方法が開示されている。この組成物を用いて、外科手術後の癒着の形成を防止する方法も開示されている。

【0168】本発明によれば、生体粘着剤または外科手術用粘着剤として有用な組成物が提供される。また、本発明によれば、多官能的に活性化した親水性の合成重合体を用いて架橋したコラーゲンを含有する生体粘着性組

\* 成物が提供される。さらに、本発明によれば、このような組成物を用いて第一の表面と第二の表面との間で癒着を起こす方法、およびこのような組成物を用いて外科手術後の癒着の形成を防止する方法が提供される。

【0169】本発明は、最も実用的で好ましい実施態様であると考えられることについて、本明細書中で示され記述されている。しかしながら、本発明の範囲内にあって、それらから逸脱する事項も作成でき、また当業者は、本開示を読めば、本発明の明らかな改良を想起することが認められる。

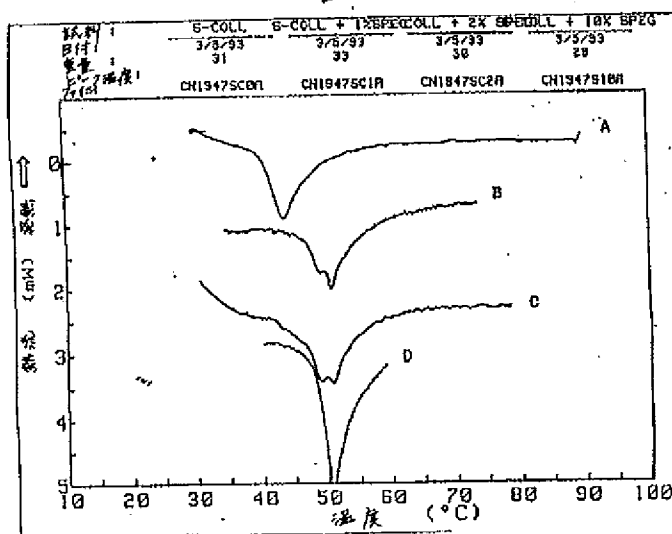
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、架橋していない繊維状コラーゲン(試料A)、および10 mg/ml、20 mg/ml、50 mg/mlおよび90 mg/mlの二官能的に活性化したSG-PEG(それぞれ、試料B、CおよびD)の示差走査熱量測定(DSC)の結果を示す。

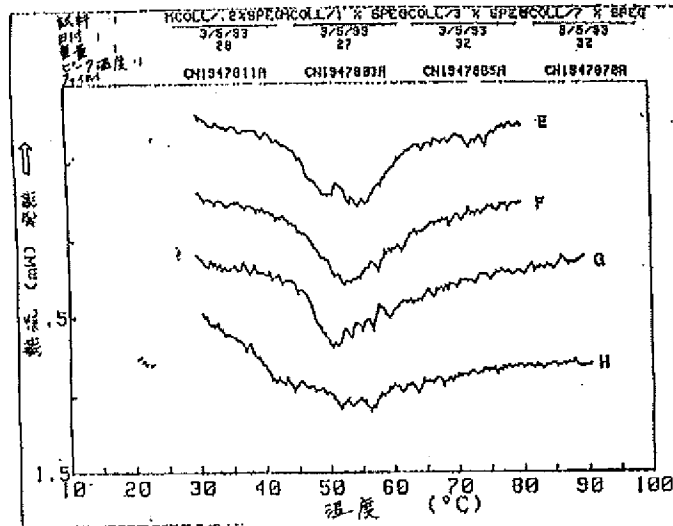
【図2】図2は、2 mg/ml、10 mg/ml、30 mg/mlおよび72 mg/mlの二官能的に活性化したSG-PEG(それぞれ、試料E、F、GおよびH)を含有するメチル化コラーゲン調製物のDSC結果を示す。

【図3】図3は、架橋していないメチル化コラーゲンのDSC結果を示す。

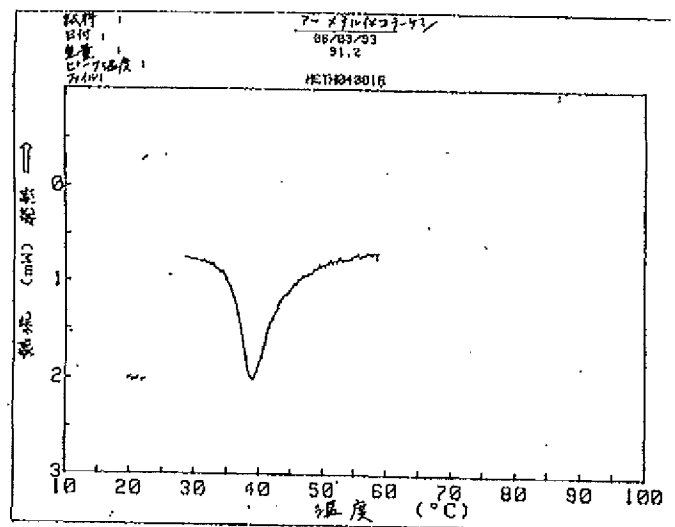
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 ブレマ アール, ラオ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95032,  
 ロス ガトス, セバスチャン コート  
 106

(72)発明者 ジョージ エイチ, チュ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95014,  
 クベルティエーノ, ミラ ビスタ アベニ  
 ュー 10530

(72)発明者 フランク エイ、 デラストロ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,  
ベルモント, デコベン アベニュー  
2517

(72)発明者 キャロル エフ、 エイチ、 ハーナー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065,  
レッドウッド ショアーズ, アボセッ  
ト ドライブ ナンバー207 2

(72)発明者 ナオミ サカイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402,  
サン マテオ, アピラ 23

(72)発明者 ジャックリーン エイ、 シュローダー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061,  
レッドウッド シティ, ウッドロー  
ストリート 1133